УДК 591.82/85

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ МИКРОМОРФОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ

П. М. Мажуга

(Институт зоологии АН УССР)

Познание биологии животного мира, его эволюции требует глубокого и всестороннего изучения закономерностей формативных и адаптационных процессов, протекающих во всех структурах организма. Динамичность биологических систем проявляется, с одной стороны, в непрерывном восстановлении их физиологических потерь, с другой стороны, в постоянных перестройках общих и частных структур в ходе развития, роста и приспособления. Поскольку оба явления весьма тесно и глубоко затрагивают форму, изменчивость биологических систем в значительной мере отражается в морфогенезе. «Организм есть нечто непрерывно меняющееся, он есть морфопроцесс» (Беклемишев, 1952, с. 8). Вся совокупность внешних форм, разумеется не исчерпывает содержания происходящих в организме изменений. Более того, внешние проявления морфогенеза являются вторичным следствием внутренних процессов, которые прямо не затрагивают внешнюю форму. Морфогенез, будучи непосредственно связанным с метаболизмом, охватывает в первую очередь звенья, являющиеся ареной метаболических и функциональных реакций, т. е. клетку, ткань, орган. Поэтому изменения, претерпеваемые какой-то структурой в ходе ее развития, отражают характер протекающих в ней процессов и обычно используются как критерий оценки ее функционального состояния. Физиологические возможности живой системы, источники ее восстановления и компенсации в каждом случае имеют свои конкретные выражения и пределы, в определении которых могут помочь исследования тканей, органов и клеток в их развитии.

Для дальнейшего прогресса биологии и медицины особое значение приобретает изучение дифференцировки клеток. Процесс дифференцировки включает цепь превращений, претерпеваемых клеткой на пути от исходной неспециализированной формы до состояния, когда она приобретает определенный вид и способность выполнять строго определенную работу, т. е. становится функционально зрелой клеткой. В этом процессе превращений кроется сущность многих биологических механизмов и в то же время — пути доступа к ним. Изучая дифференцировку клеток, можно надеяться подойти к раскрытию факторов, определяющих направление и темпы развития клеток, к познанию характера ответных реакций клеток и тканей на различные воздействия, к расшифровке иммунных и других защитных механизмов в биологических системах, равно как и к пониманию явлений изменчивости, регенерации и реституции, непрерывно протекающих во все периоды жизни организма. Это и побудило нас при постановке исследований в отделе цитологии и гистогенеза Института зоологии АН УССР уделить главное внимание изучению закономерностей дифференцировки клеток в гистогенезах.

Вопрос о дифференцировке клеток является, пожалуй, одним из наиболее разработанных в современной цитологии. Основная причина

такого положения, по нашему мнению, кроется в принципах подхода к исследованию клетки. Изучение структуры и функции клетки выполняется, как правило, на изолированных системах и даже на изолированных клетках, когда клетки извлечены из их естественной среды и лишены взаимодействий, которые они постоянно испытывают в тканевых комплексах. Одновременно объектом исследования цитологи и гистологи чаще избирают дифференцированные, функционально зрелые клетки, на которых проследить процесс их становления уже невозможно.

Возникшие затруднения можно преодолеть в цитогистогенезе, позволяющем применить разносторонние методы цитологического анализа на клетках развивающейся тканевой системы. В этом главное преимущество метода цитогистогенезов при изучении дифференцировки клеток, так как становление структур тканевого комплекса происходит при непрерывном их взаимодействии: по-видимому, влияние клеток на другие элементы столь же значительно, как и влияние последних на клетки.

Проблема дифференцировки клеток и сфера ее проявления весьма обширна. Мы ограничили свой интерес к ней в пределах некоторых производных мезенхимы. Выбор наш был определен, с одной стороны, широкими возможностями наблюдать дифференцировку клеток в развивающихся производных мезенхимы из-за их способности к быстрой и непрерывной смене поколений клеток, с другой стороны, тем, что производные мезенхимы, участвуя в процессах трофики, регенерации, иммунитета и других защитных реакциях, фактически стоят на страже целостности организма и могут служить удачными посредниками для воздействия на его общее состояние и отдельные системы. Таким образом, исследования в намечаемом плане открывают возможности теоретического и прикладного порядка.

Закономерности дифференцировки клеток в гистогенезе включают многие стороны морфологии, физиологии и биохимии клеток и тканей, охватить которые одновременно невозможно. Поэтому возникает необходимость определить главнейшие направления, разработка которых раскрывала бы больше путей доступа к решению основной проблемы. На первых порах мы сочли необходимым сосредоточить основное внимание на решении следующих вопросов, которые, по нашему мнению, в рассматриваемой проблеме весьма актуальны: 1) источники дефинитивных систем и популяций клеток; 2) метаболические показатели дифференцировки клеток и тканей; 3) физиологическая пролиферация и дифференцировка клеток; 4) механизмы формирования основного вещества и внеклеточных структур; 5) интенсивность и характер биосинтеза в дифференцирующихся клетках.

Уже сам перечень вопросов показывает, что они затрагивают различные стороны жизнедеятельности клеток и тканей и при их решении морфолог вынужден обращаться к использованию ряда методов. Именно поэтому при организации исследований в нашем отделе наряду с подготовкой научных кадров основное внимание было уделено освоению и использованию новых методов цитологического анализа: цитоэмбриологии, цито- и гистохимии, авторадиографии, культуре клеток и тканей, люминесцентной микроскопии, цитофотометрии. Для решения отдельных вопросов нам удалось разработать способы сочетания авторадиографии с гистохимией, люминесцентной микроскопией и фотометрией. В настоящее время в отделе продолжают осваивать методы цитофотометрии и электронной микроскопии.

Остановлюсь кратко на некоторых разработках по вышеупомянутым вопросам.

ИСТОЧНИКИ ДЕФИНИТИВНЫХ ТКАНЕВЫХ СИСТЕМ И ПОПУЛЯЦИЙ КЛЕТОК

В развивающихся производных мезенхимы исходной клеточной формой является, понятно, мезенхимная клетка. Однако при анализе формирования дефинитивных популяций клеток речь идет не о поисках общей исходной формы для всех производных мезенхимы, а о поисках источников дифференцировки клеток в отдельных гистогенезах. Известно, например, что костный и миэлоидный гистогенезы происходят синхронно и взаимосвязаны топографически. Тем не менее источники клеточного материала для этих гистогенезов и источники развития дефинитивных популяций клеток в том и другом гистогенезе до сих пор еще не вполне выяснены.

Наши наблюдения показывают, что при внутрихрящевом развитии кости клеточный материал в очаг энхондрального процесса поступает только с врастанием кровеносных сосудов. При этом функция основных исходных форм принадлежит эндотелиальным клеткам врастающих в хрящ сосудов и околососудистым клеткам-перицитам. Обе формы отличаются большой потенцией к размножению и дифференцировке, представляя собой исходный материал для образования клеток, участвующих в остеогенезе (остеобластов, остеокластов, остеоцитов) и в миэлогенезе (бластические формы всех рядов клеток костного мозга). При всех значительных различиях дефинитивных клеточных рядов костной и миэлоидной тканей они не лишены все же общих особенностей — развитие тех и других может происходить только в ходе субституции хрящевой ткани. В очаг энхондрального процесса поступают вместе с сосудами зрелые клетки крови и отдельные освобождающиеся хондроциты, однако роль их в костном и миэлоидном гистогенезах еще не ясна.

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ТКАНЕЙ И КЛЕТОК

Метаболизм является одним из ведущих факторов дифференцировки тканей и клеток. На основании его можно судить об интенсивности и направлении биосинтеза в клетках, а значит и о характере процесса гистогенеза. Даже генетически сходные и топографически близкие клетки при дифференцировке изменяют не только свою форму и размеры, но и функцию. Все эти превращения происходят на фоне сдвигов в процессах обмена, за которыми можно проследить по накапливаемым в клетках и вне клеток продуктам. Однако методы классической гистологии при этом мало полезны. Больше возможностей открывают количественная и качественная гистохимия, авторадиография, фотометрия, рентгеноструктурный анализ, электронная и люминесцентная микроскопия, особенно при их сочетании. Сочетание некоторых методов позволило нам установить, что способности генетически близких клеток существенно меняются в зависимости от условий, определяемых ситуацией гистогенеза. В этом легко убедиться на примере развития хондроцитов росткового хряща. Клетки его поверхностной (прилежащей к эпифизу) зоны размножаются слабо. Среди них редко встречаются фигуры делений, а также и включения радиоактивного тимидина. Эти клетки специализированы на синтезе гликогена и олигомерных аминосахаров — предшественников хондроитинсульфата. Гистохимически содержимое хондроцитов и межклеточное вещество этой зоны окрашиваются в малиновый цвет реактивом Шиффа после периодатного окисления. В средней зоне того же хряща количество клеток на экви-

валентной площади гистологического среза увеличивается в 10—15 раз за счет их интенсивного размножения. Высокому репродуктивному показателю этих клеток соответствует обильное включение ими тимидина-H^3, свидетельствующее о прогрессирующем синтезе ДНК. Одновременно изменяются и цитохимические свойства хондроцитов средней зоны: они теряют ШИК-положительный эффект и приобретают альцианофилию. Явление смены гистохимической картины в смежных зонах метаэпифизарного хряща оставалось непонятным до сочетания на одном препарате методов гистохимии и авторадиографии. Оказалось, ШИК-положительная зона хряща радиоактивный сульфат не содержит, зато он интенсивно включается альцианофильной зоной, причем распределение сульфата количественно показывают прямую связь со степенью альцианофилии. Следовательно, субстанции хряща приобретают альцианофильные свойства с включением иона сульфата, который, с одной стороны, способствует превращению олигомерных аминосахаров в высокополимерные хондроитинсульфаты и, с другой стороны, служит акцептором альцианового синего. Из этих же наблюдений вытекает и другой вывод, что интенсивное размножение клеток в растущем хряще сопровождается специализацией их к синтезу хондроитинсульфата — субстанции, свойственной зрелой хрящевой ткани. Следовательно, в ростковом хряще налицо выступает одновременное сочетание репродукции и специфического биосинтеза в клетках, т. е. явление, которое отрицали многие цитологи (Holtzer, 1961, 1963; Stockdale et al., 1963, и др.).

Картина смены обменных реакций в дифференцирующейся клетке хорошо прослеживается также по активации в ней определенных ферментных систем. Созревающий остеобласт, например, выделяется среди других клеток положительной реакцией на щелочную фосфатазу. Но даже в зрелых остеобластах количественный показатель реакции на щелочную фосфатазу зависит от степени участия их в остеопластическом процессе.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК

В науке до сих пор спорным является вопрос, за счет каких источников восстанавливаются структуры некоторых органов в процессе их физиологического изнашивания и при повреждениях. Считается, что функционально зрелые клетки не способны к размножению, поэтому не могут помочь организму в восстановлении понесенных потерь. На этой основе широко приняты трактовки, согласно которым восстановление структур таких органов, как сосуды, сердце и даже кости, является уделом специальных камбиев либо инертных функционально неполноценных тканей. Однако морфологически такие камбии выделить почти не удается. В то же время исследования с помощью специальных методов показывают, что размножаться могут не только молодые, но и зрелые специализированные клетки. Результаты наших исследований не оставляют сомнений относительно способности к делению зрелых остеобластов и (по данным Малюка, 1967а, б, в) дифференцированных клеток стенки кровеносного сосуда (эндотелиальных, гладкомышечных, фибробластов.) А это по-иному должно нацеливать биолога и врача в их оценке регенеративных возможностей функционирующей системы. Во всяком случае вопрос о размножении зрелых клеток нуждается в пересмотре на основе новых факторов и наблюдений. В пределах производных мезенхимы любая дифференцированная и активно функционирующая система способна к самовосстановлению за счет своих же

функционирующих структур. В растущем гиалиновом хряще клетки способны как к митотическому, так и к амитотическому делению (Мажуга, 1967). То же свойственно большим и средним лимфоцитам (Бондаренко, 1967), причем амитоз является приспособлением клетки к размножению без перерыва ее специфического функционирования.

ИСТОЧНИКИ И МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ МЕЖКЛЕТОЧНОГО ВЕЩЕСТВА

В каждом гистогенезе прослеживается тесная взаимосвязь между дифференцировкой клеточных элементов ткани и ее межклеточных структур. Тем не менее источники возникновения и регенерации межклеточного вещества во многом еще не ясны. Это, в частности, касается источников продуцирования компонентов плазмы крови, основного вещества миокарда, стенок кровеносных сосудов, суставного хряща и др. Ответ на вопрос об источниках межклеточного вещества можно получить только путем изучения клеток в тканевых комплексах. В этом преимущество метода цито-гистологии перед цитологией изолированных клеток. Гисторадиография с применением меченых предшественников белков и мукополисахаридов позволила установить способность дифференцированных клеток стенок кровеносных сосудов и хряща продуцировать субстанции основного вещества ткани. Динамика включения метионина-S^{35} и сульфата-S^{35} в стенке кровеносного сосуда свидетельствует о том, что белок и мукополисахариды вырабатывают «на экспорт» не только фибробласты и эндотелиальные клетки, но и гладкомышечные клетки (Малюк, 1967 а, б, в; Мажуга и др. *).

Выше уже упоминалось о последовательной смене биосинтеза мукополисахаридов в дифференцирующихся хондроцитах росткового хряща. При этом налаживание биосинтеза хондроитинсульфата сопровождается синхронной специализацией хондроцитов к продуцированию белков коллагенового типа. Включение пролина-C^{14} как одного из предшественников коллагена зарегистрировано в наших опытах в зонах хряща, активно ассимилирующих радиоактивный сульфат.

На основании исследований, выполненных в отделе, можно также определенно судить об участии всех форм лимфоцитов в выработке белковых фракций сыворотки крови. Эти же исследования показывают, что интенсивность синтеза специфических белков клетками одного и того же вида изменяется в ходе их последовательной дифференцировки. По данным исследований, проведенных в нашей лаборатории О. Д. Бондаренко, большие лимфоциты уже в течение первых 15 минут после введения изотопа в организм включают метионина-S^{35} в два раза больше, чем средние, и в восемь—десять раз больше, чем малые. При этом почти половину включенного изотопа большие лимфоциты теряют в первые сутки, средние — в течение $2^1/_2$ суток, малые — в течение 15—20 суток. Подобная же закономерность прослеживается и в биосинтезе мукополисахаридов. На гистоавтографах росткового хряща видно, что наиболее интенсивно (если не исключительно) радиоактивный сульфат включают хондроциты средней зоны, почти не включают — клетки поверхностной и глубокой зон. Таким образом, продуцирование сульфированных мукополисахаридов в растущем хряще является функцией не всех его клеток, а только клеток на определенных стадиях диффе-

* Мажуга П. М. и др. Особенности нуклеинового, белкового и мукополисахаридного обмена некоторых производных мезенхимы по данным авторадиографических исследований. Доложено на III Всесоюзн. совещ. по развитию исследования соединительной ткани. Новосибирск (в печати).

ренцировки. Выводы о внутриклеточном синтезе хондроитинсульфата подтверждаются электронномикроскопически и цитохимически.

Анализ ультраструктуры дифференцирующихся клеток позволяет проследить за последовательной сменой процессов биосинтеза в клетке и, таким образом, выявить источники и некоторые механизмы формирования протеиновых и мукополисахаридных компонентов межклеточного вещества хряща. Оказывается, специализация клетки на биосинтезе определенного продукта сопровождается своеобразной перестройкой и приспособлением ее внутренней структуры: эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, митохондрий (Мажуга, Черкасов, 1967) *. Поэтому избирательное включение радиоактивного сульфата и пролина хондроцитами средней зоны метаэпифизарного хряща следует, по-видимому, рассматривать не как результат одновременного сочетания в каждой клетке продуцирования коллагена и хондроитинсульфата, а скорее как распределение этих функций между отдельными клетками.

ИНТЕНСИВНОСТЬ И ХАРАКТЕР БИОСИНТЕЗА В ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ КЛЕТКАХ

В предыдущих разделах мы уже подчеркивали, что современные методы цитологии позволяют с большой достоверностью судить о направлении и интенсивности биосинтеза в клетках. В наших исследованиях с этой целью используются методы люминесцентной микроскопии, цитохимии, авторадиографии и фотометрии. Запланировано освоение в ближайшее время цитофотометрии в ультрафиолетовой области спектра.

Применение радиоактивных предшественников нуклеиновых кислот, белков и других макромолекулярных соединений дает возможность проследить за локализацией процессов биосинтеза, их динамикой, а также за состоянием единичных клеток и отдельных дифференцировок в гистогенезе.

В культуре клеток лимфатического узла в одних условиях ретикулярные клетки активно синтезируют ДНК (что видно по обильному включению тимидина-H^3) и продуцируют себе подобных. В культурах такого же возраста, но находящихся в других условиях, ретикулярные клетки не включают тимидин-H^3, зато проявляют способность к метаморфозу в другие лимфоидные клетки. Для оценки состояния клеточного метаболизма, особенно в гетероморфных популяциях, мы используем также люминесцентную микроскопию. С успехом этот метод применен при изучении миэлогенеза (Мажуга, Шевченко, 1967; Левченко, Мажуга, 1967). Однообразные на первый взгляд клетки развивающегося костного мозга в одном и том же очаге дают пеструю картину люминесценции, свидетельствующую о различиях в их содержимом и состоянии, хотя все эти клетки являются потомками единых исходных форм. Следовательно, представляется возможность уже на ранних стадиях миэлогенеза регистрировать качественный состав клеток развивающейся ткани и достоверно определить направление и степень дифференцировки ее клеток. А это уже само по себе весьма существенно как для оценки состояния развивающихся структур, так и для обоснования ряда практических выводов.

---

* См. также Мажуга П. М., Черкасов В. В. Особенности ультраструктуры дифференцирующихся хондроцитов. Доложено на III Всесоюзн. совещ. по развитию исследования соединительной ткани. Новосибирск (в печати).

Метод люминесцентной микроскопии при всей его простоте и доступности находит успешное применение также при изучении нуклеинового и полисахаридного обмена в клетках, а также возрастных особенностей опорных тканей (Мажуга, Харчук, 1966, 1967).

Из краткого обзора результатов некоторых наших исследований вытекает, что процессы дифференцировки, репродукции и метаболизма в клетках носят адаптивный характер и могут рассматриваться только в связи с конкретными условиями и обстановкой. Такой подход к изучению проблемы дифференцировки помогает глубже оценивать многие биологические явления.

ЛИТЕРАТУРА

Беклемишев В. Н. 1952. Основы сравнительной анатомии беспозвоночных. М.

Бондаренко Э. В. 1967. К вопросу об особенностях роста и развития лимфоидных клеток вне организма. Мат-лы VIII научн. конф. по возрастной морфологии, физиологии и биохимии. М.

Левченко Ж. Т., Мажуга П. М. 1967. Люминесценция клеток развивающегося костного мозга. Там же.

Мажуга П. М. 1967. Трета конференция на анатомите и хистолозите в България. Пловдив.

Мажуга П. М., Харчук Л. Н. 1966. Исследование структур суставного хряща методом люминесцентной микроскопии. В сб.: «Цитология и генетика», в. 2. К.

Их же. 1967. Возрастные особенности суставного хряща по данным люминесцентной микроскопии. Мат-лы VIII научн. конф. по возрастной морфологии, физиологии и биохимии. М.

Мажуга П. М., Черкасов В. В. 1967. Функциональные комплексы органелл в дифференцирующихся хондроцитах (электронномикроскопическое исследование). Цитология и генетика, № 5.

Мажуга П. М., Шевченко Ж. Т. 1967. Люминесценция дифференцирующихся клеток костного мозга. Цитология и генетика, № 4.

Малюк В. И. 1967а. Мукополисахариды эндотелия артериальных магистралей конечностей в онтогенезе крысы. Цитология и генетика, № 2.

Его же. 1967б. Авторадиографическое исследование динамики включения S^{35}-сульфата в артериальную стенку крыс в постнатальном онтогенезе. Мат-лы VIII научн. конф. по возрастной морфологии, физиологии и биохимии. М.

Его же. 1967в. Оновлення фібробластів у стінці грудної протоки за даними авторадіографічного дослідження з тимідіном-H^3. ДАН УРСР, сер. біол., № 12.

Holtzer H. 1961. Aspects of chondrogenesis and myogenesis. In: «Synthesis of molecular and cellular structures». N. Y.

Его же. 1963. Mitosis and cell transformation. In: «General physiology of cell specialization». N. Y.

Stockdale F. E., Abbott J., Holtzer S. and Holtzer H. 1963. The loss of phenotypic traits by differentiated cells. II. Behavior of chondrocytes and their progeny in vitro, Dev. Biol., v. 7.

Поступила 11.IV 1968 г.

URGENT PROBLEMS OF THE ANIMAL MICROMORPHOLOGY

P. M. Mazhuga

(Institute of Zoology, Academy of Sciences, Ukrainian SSR)

Summary

The author presents a short review of the investigations carried out at the Department of cytology and histogenesis of the Institute of Zoology of the Ukrainian Academy of Sciences with application of various modern methods of cytological analysis and concerning the structural, functional and metabolic indices of cellular differentiation. On the example of some derivatives of mesenchyme, the author also briefly considers the sources of definitive tissue systems and cell populations, the correlation of differentiation and physiological proliferation of cells, some mechanisms of forming ground substance and extracellular structure, intensity and type of biosynthesis in cells, found out in histogeneses of cartilaginous, bone, myeloid and some other tissues.